用于植物蛋白互作研究的酵母基于杂交的分裂泛素化（mbSUS）系统

张犇*

山西大学生命科学学院，太原，030006

摘要：蛋白-蛋白相互作用对于植物细胞生理活动至关重要。为检测和确定两种蛋白之间的相互作用，许多不同的体内和体外方法已被发表。而酵母基于杂交的分裂泛素化（mbSUS）系统是经典的酵母双杂交技术替代方法，它不仅具有酵母双杂交快速便捷的优点，还弥补了传统酵母双杂交法在待测蛋白要求，假阳性率等方面的不足。目前，经过改进的 mbSUS 法可用于膜蛋白以及可溶性蛋白互作研究，并在植物中用于检测离子通道与膜转运蛋白的互作。本文对 mbSUS 法技术原理、实验方法以及实验注意事项进行详细描述，为植物蛋白互作研究奠定基础。

关键词：植物，蛋白-蛋白相互作用，酵母，mbSUS

在过去的几十年中，已经建立了多种检测体内或体外蛋白质相互作用的技术，包括经典的酵母双杂交（Yeast-2-Hybrid，Y2H）技术和荧光能量共振转移技术（Förster Resonance Energy Transfer，FRET）、免疫共沉淀技术（Co-Immunoprecipitation，Co-IP），双分子荧光互补技术（Bimolecular Fluorescence Complementation，BiFC），以及融合蛋白沉降技术（Pull-down）。这些方法已经在植物蛋白互作研究中得到广泛使用（Xing et al., 2016）。其中，Y2H 技术由于操作简单、成本便宜，在大多数研究中作为首选方法，特别是在大规模筛选潜在互作蛋白的实验中得到广泛运用（Xing et al., 2016）。然而，由于待测蛋白连接的转录激活因子只有进入细胞核才能发挥功能，Y2H 技术不适于大分子量蛋白及膜蛋白相互作用的检测。同时，由于存在自激活效应，Y2H 技术也存在着假阳性较高的缺点。为了解决这些问题，基于 Y2H 技术建立了酵母基于杂交的分裂泛素化系统（mating-based Split-Ubiquitin System，mbSUS）。

图 1A 展示了用于蛋白相互作用检测的 mbSUS 法基本原理。酵母泛素化标记蛋白被一分为二（Nub 与 Cub），其中 C 端 Cub 连接了报告基因复合体（ProteinA-LexA-VP16，PLV）。为了避免两段泛素化标记蛋白自发结合，N 端第十三个氨基酸由野生型异亮氨酸（NubI）突变为甘氨酸（NubG）。此时，将待测蛋白 X,Y 分别连接到 NubG 与 CubPLV 上，得到融合蛋白 X-NubG 作为猎物（Prey）与 Y-CubPLV 作为诱饵（Bait）。如果 X 和 Y 存在相互作用，两段泛素化标记蛋白将重新结合发挥功能，泛素特异性蛋白酶将识别标记，切断 Cub 连接的报告基因复合体 PLV。PLV 进入细胞核，启动报告基因，从而达到筛选蛋白相互作用这一目的。为了更清楚展示互作对酵母生长的影响，诱饵蛋白在 met25 启动子控制下，受培养环境中甲硫氨酸浓度负向调控表达。图 1B 所示为 mbSUS 法中 Bait 与 Prey 载体结构。mbSUS 法各载体包含 Gateway 反应框，可以通过 Gateway 反应将待测蛋白基因转入载体中。Prey 中仅表达 NubG 与 NubI 将作为阴性与阳性对照。

*通讯作者：benzhang@sxu.edu.cn

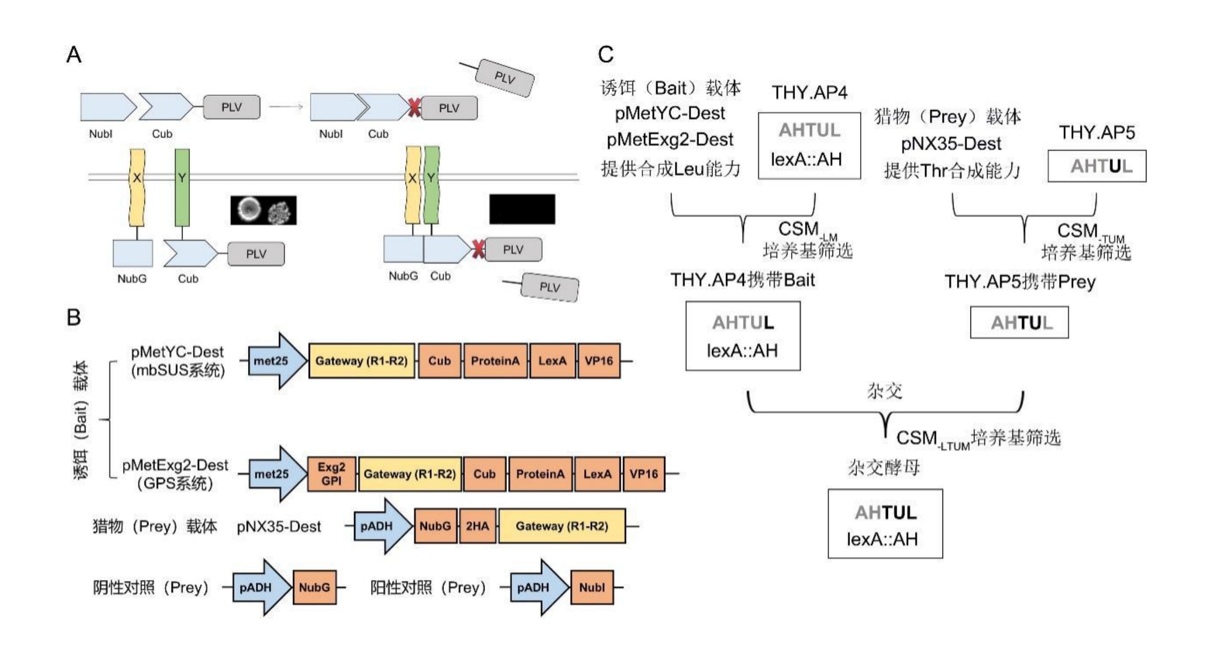


图 1.酵母 mbSUS 法基本原理

Figure 1. The principles of mbSUS assay.

A. mbSUS 法原理简图。B. mbSUS 法所使用的各个载体。C. mbSUS 法中酵母筛选流程。方框中字母显示酵母氨基酸合成能力。灰色表明无法合成，黑色表明通过转入克隆或杂交获得合成能力。

A. Schematic representation of the split-ubiquitin system. B. The vectors used in mbSUS assay. C. The yeast screening process of mbSUS assay. The letters in square box shows the capability of amino acid syntheses in yeast. The letter in grey indicates the amino acid cannot be syntheses in yeast, while letters in black shows yeast get capability of amino acid syntheses by clone transformation or mating.

相较于传统 Y2H 法，mbSUS 法中进入细胞核的是切断释放的 PLV 而非含待测蛋白的融合蛋白，其结果假阳性率大大降低。同时，可以在细胞膜上检测大分子膜蛋白间相互作用。目前，mbSUS 法已经被成功用于植物膜蛋白相互作用研究，如发现细胞质膜钾离子通道 KC1、KAT1 与 SNARE 蛋白及膜转运相关蛋白 SEC11 间的互作（Grefen et al., 2010, 2015; Zhang et al., 2015; Karnik et al., 2015）。由于 mbSUS 法要求 Bait 必须是膜蛋白，为了进一步扩大该方法的应用范围，如图 1B 所示，通过在诱饵融合蛋白 N 端连接 GPI 锚定蛋白肽段（Exg2GPI），获得了 GPS 系统（GPI signal peptide-anchored split-ubiquitin system），使得小分子可溶性蛋白也可作为 Bait，利用 mbSUS 系统开展蛋白互作研究（Zhang et al., 2018）。该系统已成功用于植物 SEC11 截断蛋白的互作蛋白筛选（Zhang et al., 2019）。至此，mbSUS 法已经可以用于膜蛋白及可溶性蛋白互作研究，是传统 Y2H 技术的替代方法。下面，我们将详细介绍 mbSUS 法的实验方法以及实验注意事项。

1 材料与方法

1. 1 载体与菌株

Gateway 反应所需入门载体可为 pDONR207（Thermo Fisher Scientific）或其它包含 attP1-attP2 Gateway 框的载体。图 1B 及图 1C 中展示了实验所需酵母表达载体结构。pMetYC-Dest（Grefen et al., 2009），pMetExg2-Dest（Zhang et al., 2018）及 pNX35-Dest（Grefen and Blatt, 2012）载体信息可以自 https://psrg.org.uk/resources 获得。实验所需酵母

（*Saccharomyces cerevisiae*）菌株如表 1 所示。

表 1. 用于 mbSUS 法的酵母菌株

Table 1. Yeast strains used for mbSUS assay

Name	Genotype	Function
THY.AP4	MATa; ade2⁻, his3⁻, leu2⁻, trp1⁻, ura3⁻; lexA::ADE2, lexA::HIS3, lexA::lacZ	Bait protein expression
THY.AP5	MATa; URA3; ade2⁻, his3⁻, leu2⁻, trp1⁻	Prey protein expression

1. 2 试剂及配方

合成六缺培养基（CSM-ADE-HIS-LEU-MET-TRP-URA），MP Biomedicals, 货号：114560222。

无氨基酵母氮源（YNB），北京索莱宝科技有限公司，货号：Y8040。

鲑鱼精 DNA（ssDNA），北京索莱宝科技有限公司，货号：D8030。

琼脂（Oxoid agar No.1），Oxoid，货号：LP0011。

PEG3350，Sigma-Aldrich，货号：P3640。

BP Clonase®II Enzyme Mix， Thermo Fisher Scientific， Invitrogen™，货号：11789020。

LR Clonase®II Enzyme Mix， Thermo Fisher Scientific， Invitrogen™, 货号：11791020。

免疫印迹分析所需抗体：

一抗:anti-HA（1:20000，Anti-HA high-affinity Rat monoclonal antibody），Roche Diagnostics, 货号：11867423001。anti-VP16（1:20000, Anti-VP16 tag antibody in Rabbit），Abcam，货号：ab4808。

二抗:anti-rabbit HRP（1:20000, goat anti-rabbit IgG-HRP）， Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™, 货号：G-21234。anti-rat HRP（1:20000, Rabbit anti-Rat IgG H&L [HRP]），Abcam，货号 ab6734。

其它试剂均购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

所用试剂配方如表 2 所示。酵母选择性培养基配方如表 3 所示。

表 2. mbSUS 实验流程中所使用的相关试剂配方

Table 2. Related reagent formulations used in the mbSUS assay

Solution	Compostion and concentration	Sterilization	Store
YPD media	2% peptone, 2% glucose, 1% yeast extract, 2% agar. Adjust pH to 6.0 with 1 mol•L^{-1} KOH.	Autoclaving	4 °C
LiAc solution	1 mol•L^{-1} or 0.1 mol•L^{-1}, Adjust the pH to 7.5 with acetic acid	Filtration (0.22 μm)	Room temperature
ssDNA solution	10 mg•mL^{-1} in de-ionized water, boil for 5 min following cooling on ice before use.	Filtration (0.22 μm)	-20 °C
PEG3350 solution	50% (w/v) in de-ionized water, avoid water loss during storage	Filtration (0.45 μm)	Room temperature
CSM-minimal media	6.7 g•L^{-1} YNB, 20 g•L^{-1} glucose, 0.55 g•L^{-1} CSM-ADE-HIS-LEU-MET-TRP-URA, adjust pH to 6.0 with fresh prepared 1 mol•L^{-1} KOH. Add 20 g•L^{-1} agar if solid media is needed.	Autoclaving	4 °C

'Lyse & Load' buffer	50 mmol•L^{-1} Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 8 mol•L-1 urea, 30% glycerol, 0.1 mol•L^{-1} DTT, 0.005% bromophenol blue	-	-20 °C
ADE solution	4 g•L^{-1} adenine sulphate (add 5 mL per liter media)	Filtration (0.22 µm)	4 °C
URA solution	4 g•L^{-1} uracil (add 5 mL per liter media)	Filtration (0.22 µm)	4 °C
LEU solution	20 g•L^{-1} L-leucine (add 5 mL per liter media)	Filtration (0.22 µm)	4 °C
TRP solution	4 g•L^{-1} L-tryptophane (add 5 mL per liter media)	Filtration (0.22 µm)	4 °C
HIS solution	4 g•L^{-1} L-histidine (add 5 mL per liter media)	Filtration (0.22 µm)	4 °C
MET solution	15 g•L^{-1} L-methionine (equals a 0.1 mol•L^{-1} stock solution, add appropriate amount to obtain 0.5, 5, 50, and 500 µmol•L^{-1} final concentrations)	Filtration (0.22 µm)	4 °C

表 3. mbSUS 法选择性培养基配方

Table 3. The selection media used for mbSUS assay

Media	Reagent for selection	Comment
CSM_{-TUM} Media	ADE, HIS, LEU	Transformation of Prey clones in THY.AP5.
CSM_{-LM} Media	ADE, HIS, TRP, URA	Transformation of Bait clones in THY.AP4.
CSM_{-LTUM} Media	ADE, HIS	Yeast mating check
$CSM_{-AHLTUM}$ Media with Met	MET	Yeast growth check

1.3 仪器设备

控温摇床，培养箱，台式冷冻离心机，PCR 仪，水浴锅，免疫印迹设备，超净台，微量分光光度计（Nano-300，杭州奥盛仪器有限公司），扫描仪，超声破碎仪（UP-250，宁波新芝生物科技股份有限公司）。

2 实验方法

酵母相关所有实验需在无菌条件下进行。

2.1 酵母转化

1) 用于转化酵母的 Bait 或 Prey 克隆通过 Gateway 反应（Thermo Fisher Scientific）获得，具体方法参照厂商说明书。
2) 用无菌牙签从-80 °C 储存管或预先培养好的平板上挑取 THY.AP4 和 THY.AP5 酵母，接种在 5 mL YPD 培养基中，200 rpm，28 °C 过夜培养。
3) 将过夜培养物与 45 mL YPD 培养基混合，200 rpm，28 °C 培养 3-5 小时，直至 OD600 为 0.6-0.8。
4) 离心（2000 g，4°C，10 分钟）收集细胞，弃上清液。
5) 用 20 mL 无菌水洗涤沉淀，再次离心（2000 g，4 °C，10 分钟），弃上清液。
6) 用 1.8 mL 0.1 mol•L^{-1} LiAc 重悬细胞，转移到 2 mL EP 管中，离心（2,000 g，4 ℃，30 秒），弃上清液。
7) 加入适量的 0.1 mol•L^{-1} LiAc（转化样品数乘以 20 µl），室温放置 30 分钟，获得感受态酵母。
8) 在无菌的 PCR 管中加入 10 µL ssDNA 溶液和 5 µL 样品 DNA（> 100 ng•µL^{-1}）。
9) 准备混合物：每一转化样品，需 70 µL PEG3350 溶液，10 µl 1 mol•L^{-1} LiAc 和 20 µL 感受态酵母（来自步骤 6）。
10) 将混合物与来自步骤 8 的 DNA 混合。
11) 在 PCR 仪中，30 °C 孵育 30 分钟，并在 43 °C 下热冲击细胞 20 分钟。

12) 以 2000 g 离心酵母 1 分钟，弃上清液。
13) 用 100 µL 无菌水洗涤酵母，离心弃上清液。
14) 将酵母重悬于 50 µL 无菌水中并涂布在适当的选择性培养基（如图 1C 所示，THY.AP4 涂布于 CSM_{-LM} 固体培养基，THY.AP5 涂布于 CSM_{-TUM} 固体培养基）。
15) 28°C 孵育 48-72 小时。

2.2 酵母杂交与选择性培养基培养

1) 挑取 5-15 个转化 Prey 质粒的 THY.AP5 酵母菌落，接种于 3 mL CSM_{-TUM} 液体培养基。200 rpm，28 °C 生长过夜。
2) 挑选 5-15 个转化 Bait 质粒的 THY.AP4 酵母菌落，接种于 3 mL CSM_{-LM} 液体培养基。200 rpm，28 °C 生长过夜。
3) 保留 750 µL 酵母过夜培养产物，与 250 µl 60%甘油混合，液氮速冻后，至于-80 ℃保存。
4) 室温下 2000 g 离心 1 分钟收获酵母细胞并重悬于 YPD 液体培养基中(所需培养基体积按杂交配对数乘以 20 µL 计算)。
5) 将携带有 Bait 和 Prey 的酵母各取 20 µL，混合在无菌 PCR 管中，将 5 µl 混合酵母滴加到 YPD 平板上，28 °C 孵育过夜杂交。
6) 用无菌牙签将杂交酵母从 YPD 平板转移到 CSM_{-LTUM} 平板上（如图 1C 所示），在 28°C 下过夜生长。
7) 从 CSM_{-LTUM} 平板中挑取每个样品的杂交酵母菌落，并接种于 3 mL 的 CSM_{-LTUM} 液体培养基，在培养箱中以 200 rpm 振荡，28 °C 生长过夜。
8) 将 1 mL 过夜培养杂交酵母接种到 4 mL 新鲜 CSM_{-LTUM} 液体培养基中，200 rpm，28 °C 培养 4-6 小时后收集，用于免疫印迹分析。
9) 测定来自步骤 7 的酵母细胞的 OD600。
10) 从步骤 7 收集酵母中取 200 µL 细胞在室温下以 2,000 g 离心 1 分钟，并分别在无菌水中稀释至 OD600 1.0 和 0.1。
11) 在 CSM_{-LTUM} 和含不同浓度甲硫氨酸（0.5，5，50，500 µmol•L^{-1}）$CSM_{-LTUMAH}$ 平板上滴加 4 µl 步骤 10 获得的酵母。28 ℃下培养 24-72 小时。CSM_{-LTUM} 平板在培养 24 小时后取出，$CSM_{-LTUMAH}$ 平板在 72 小时后取出，检查酵母生长情况，并通过扫描仪或照相机拍照记录。

2.3 酵母蛋白表达免疫印迹分析

1) 取 2.2 步骤 8 获得的酵母培养菌液，测定 OD600。
2) 离心收集 2 mL 酵母菌液，根据 OD600 测定值，重悬于 50-100 µl 无菌水中，使样品中酵母浓度一致（所需无菌水体积可以计算如下：酵母菌液稀释 10 倍后 OD600 为 0.5，则酵母菌液 OD600 为 5，2 mL 菌液离心收集获得酵母对应计算值为 10，若最终样品酵母浓度设置为 100，则 2 mL 离心收集酵母重悬于 100 µL 无菌水中，可获得计算值为 100 的样品）。
3) 在步骤 2 获得的酵母样品中，加入等体积 Lyse and Load 缓冲液。
4) 利用超声粉碎机充分裂解酵母（振幅 10 处理 20 秒，样品需至于冰上）。
5) 65 °C 水浴 30 分钟。
6) 4000 g 室温离心 1 分钟，上清液可用于免疫印迹分析，或于-20 °C 保存 4-6 周。
7) 免疫印迹分析按照一般实验步骤进行。

3 实验注意事项

1) 如图 1 所示，在构建酵母 Bait 或 Prey 表达克隆过程中，需注意 CubPLV 连接在融合蛋

白 C 端，NubG 连接在融合蛋白 N 端。CubPLV 及 NubG 需在细胞质中。

2) 分子量小于 40 kDa 的蛋白可以通过核孔以被动扩散形式进入细胞核，同时一些较大蛋白分子也可能进入细胞核（Marfori et al., 2011）。因此，如图 1A 所示，为了尽可能减小 Bait 融合蛋白进入细胞核激活报告基因对实验的影响，作为 Bait 的待测蛋白需为膜蛋白。如图 1C 所示，为了使可溶性蛋白可以作为 Bait 用于 mbSUS 实验，在 GPS 系统中，通过在 Bait 载体 Gateway 框 5'端连接了 GPI 锚定蛋白肽段，该肽段可以有效避免 Bait 蛋白进入细胞核中（Zhang et al., 2018）。虽然在我们的实验中尚未发现，但无法彻底排除由于连接 GPI 锚定蛋白肽段而发生非特异性互作的可能。因此，如待测 Bait 蛋白为膜蛋白，推荐使用无 GPI 锚定蛋白肽段 Bait 载体。
3) 在 mbSUS 体系中，Bait 蛋白在 met25 启动子控制下表达，添加甲硫氨酸会抑制蛋白表达（Grefen et al., 2009）。然而，在实验中我们发现完全不添加甲硫氨酸，Bait 表达也会受到严重影响，因此建议在配制 $CSM_{-LTUMAH}$ 平板时添加至少 0.5 μmol•L^{-1} 甲硫氨酸。
4) 在向各平板滴加酵母菌液前，最好在超净台将平板吹干 30 分钟，这样可以获得圆形酵母生长菌落。
5) 推荐预先将滴加标记印制在纸上（如图 1C 所示），垫在平板下再滴加酵母菌液。
6) 用于免疫印迹分析的酵母，不推荐过夜培养。如 2.2 步骤 8 所示，将 1 mL 菌液与 4 mL 新鲜 CSM_{-LTUM} 液体培养基混合，培养 4-6 小时后收集，可以获得理想结果。
7) 按照 2.2 步骤 3 收集的菌液，可以在-80 °C 长期保存。根据我们的经验，每年最好重新活化已冻存细胞一次。
8) 根据我们的经验，在准备含离子通道类膜蛋白酵母样品用于免疫印迹分析时，应避免对样品进行 80 °C 以上水浴处理。

参考文献

Grefen C, Chen Z, Honsbein A, Donald N, Hills A, and Blatt MR (2010). A novel motif essential for SNARE interaction with the K^+ channel KC1 and channel gating in Arabidopsis. Plant Cell 22, 3076 - 3092.

Grefen C, Karnik R, Larson E, Lefoulon C, Wang Y, Waghmare S, Zhang B, Hills A, and Blatt MR (2015). A vesicle-trafficking protein commandeers Kv channel voltage sensors for voltage-dependent secretion. Nat. Plants, 15108.

Grefen C, Obrdlik P, and Harter K (2009). The Determination of Protein-protein Interactions by the Mating-based Split-ubiquitin system (mbSUS). In Methods in Molecular Biology, pp. 217 - 233.

Grefen C and Blatt MR (2012). Do calcineurin B-like proteins interact independently of the serine threonine kinase CIPK23 with the K^+ channel AKT1? Lessons learned from a menage a trois. Plant Physiol 159, 915-919.

Karnik R, Zhang B, Waghmare S, Aderhold C, Grefen C, and Blatt MR (2015). Binding of SEC11 Indicates Its Role in SNARE Recycling after Vesicle Fusion and Identifies Two Pathways for Vesicular Traffic to the Plasma Membrane. Plant Cell 27, 675-694.

Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NFW, Curmi PM, Forwood JK, Bodén M, and Kobe B (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1813, 1562-1577.

Xing S, Wallmeroth N, Berendzen KW, and Grefen C (2016). Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo. Plant Physiol. 171, 727-758.

Zhang B, Karnik R, Alvim J, Donald N, and Blatt MR (2019). Dual sites for sec11 on the

snare syp121 implicate a binding exchange during secretory traffic. Plant Physiol. 180, 228 - 239.

Zhang B, Karnik R, Donald N, and Blatt MR (2018). A GPI signal peptide-anchored split-ubiquitin (GPS) system for detecting soluble bait protein interactions at the membrane. Plant Physiol. 178, 13-17.

Zhang B, Karnik R, Wang Y, Wallmeroth N, Blatt MR, and Grefen C (2015). The Arabidopsis R-SNARE VAMP721 Interacts with KAT1 and KC1 K^+ Channels to Moderate K^+ Current at the Plasma Membrane. Plant Cell 27, 1697-1717.

The yeast mating-based Split-Ubiquitin System (mbSUS) used in the determination of protein-protein interaction in plant.

Ben Zhang*

School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract The protein-protein interactions (PPIs) have a pivotal role in plant cells. There are numerous methods, *in vivo* or *in vitro,* have been developed to investigate the PPIs. The yeast mating-based Split-Ubiquitin System (mbSUS) is an alternative method of classic yeast-two-hybrid (Y2H) method. The mbSUS assay is not only as fast and inexpensive as the Y2H method, but also suitable for membrane proteins investigation with lower false positive rate. The recently improved mbSUS assay is suitable for the determination of PPIs among membrane proteins and soluble proteins, and successful used for detecting the interaction between ion channels and vesicle traffic proteins. Here, we describe the principles, protocols and experiment notes for mbSUS assay, providing an alternative method for PPI research in plants.

Key words plant, protein-protein interaction, yeast, mbSUS

---

* Author for correspondence. E-mail: benzhang@sxu.edu.cn